

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-141899

(43)Date of publication of application : 24.05.1994

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
C12N 15/00
C12N 15/10
C12Q 1/04
//(C12Q 1/04
C12R 1:225)

(21)Application number : 04-317920

(71)Applicant : SAPPORO BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 04.11.1992

(72)Inventor : TSUCHIYA YOICHI
KANO YUKINOBU

(54) METHOD FOR HIGHLY SENSITIVELY DETECTING LACTOBACILLUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To rapidly and highly sensitively detect the lactobacilli by extracting the DNA of the lactobacilli from a specimen containing the lactobacilli, coprecipitating tRNA, recovering the DNA, and

subsequently subjecting the DNA to a PCR using a specific primer.

CONSTITUTION: A specimen containing lactobacilli is filtered with a polycarbonate membrane filter, and the filter is subjected to an ultrasonic treatment in a volatile solvent, which is then evaporated.

The obtained specimen is treated with lysozyme, mutanolysin, proteinase K and SDS, and the DNA of the lactobacilli is extracted.

The extract is treated with ethanol to coprecipitate tRNA, and the DNA of the lactobacilli is recovered. The recovered DNA is subjected

to a PCR using an oligomer having a sequence of formula I or II originated from the gene of rRNA or having a sequence complementary

with the sequence of formula I or II to amplify a sequence specific to the lactobacilli bacteria, and the presence of the lactic acid is

subsequently judged.

5'-TGTCGTGGCGATAGGCTGAA-3'

5'-CGGTGGCAAGCTCCTATCCT-3'

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.09.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 07.10.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-141899

(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A	A 7823-4B		
C 1 2 N 15/00		A 8931-4B		
15/10				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
// (C 1 2 Q 1/04				

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-317920

(22)出願日 平成4年(1992)11月4日

(71)出願人 000002196

サッポロビール株式会社

東京都中央区銀座7丁目10番1号

(72)発明者 土屋 陽一

静岡県焼津市岡当目10番地 サッポロビ
ル株式会社醸造技術研究所内

(72)発明者 狩野 幸信

静岡県焼津市岡当目10番地 サッポロビ
ル株式会社醸造技術研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 乳酸菌の高感度検出法

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 乳酸菌を含む検体より、乳酸菌のDNAを抽出し、この抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈澱処理することにより乳酸菌のDNAを回収する。このDNAに対して下記の配列群の少なくとも1つを有するか又は該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う。

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-
3'

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-
3'

【効果】 ビールなどの食品に含まれる乳酸菌を非常に高感度、かつ短時間に検出することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程よりなる乳酸菌の高感度検出法。

(1) 乳酸菌を含む検体をポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて濾過する工程、(2) 該フィルターを、揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させた後、揮発性溶液を蒸発させる工程、(3) 上記工程で得た検体試料をlysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSで処理することによ

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' (a)

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

【請求項2】 揮発性溶液が、エタノールである請求項1記載の方法。

【請求項3】 プライマーが、請求項1記載の各オリゴヌクレオチドの配列のうち、少なくとも連続した10塩基以上を含むオリゴヌクレオチドである請求項1記載の方法。

【請求項4】 PCRを行う際に、Pfu Polymeraseを使用する請求項1記載の方法。

【請求項5】 乳酸菌の検出を、ポリアクリルアミド電気泳動またはアガロース電気泳動および臭化エチジウムによる核酸染色により行う請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、乳酸菌の迅速かつ高感度な検出法に関し、詳しくは食品、特にビールの品質に悪影響を及ぼす*Lactobacillus brevis*をはじめとする乳酸菌の検出法に関するものである。

【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】 食品、特にビール製造において、乳酸菌はその耐酸性と耐アルコール性から最も重要な有害菌である。そのため、ビールなどの食品中から該乳酸菌を迅速かつ高感度に検出する方法の開発が待望されている。かかる要望に応えるべく我々は研究を重ね、既に特願平3-191114号にお

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' (a)

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

【0004】 検体中の極少数の微生物の検出をPCRを用いて行うことを考えた場合、まず初めに検体の容量

(通常は数百ml)をいかに効率よく減らしてPCRにかけられるような数十 μ lという容量にするかということが問題となる。そこで、本発明においては、まずポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて検体を濾過し乳酸菌を捕獲する。ここで、フィルターの材質であるポリカーボネートとしては特に制限はないが、ビスフェノール系のものが好ましい。フィルターは、膜厚が100 μ 以下、孔径が1 μ 以下、特に0.6 μ 以下のものが好適である。従来は、主に親水性ポリフッ化ビニリデン系メンブランフィルターが使用されていたが、乳酸菌の回収率が十分とは言えなかった。ポリカーボネート製メン

って乳酸菌のDNAを抽出する工程、(4) 上記工程で得た抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する工程、

(5) 乳酸菌DNAに対して、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う工程、

いて、250mlのビール中にわずか30菌体の*L. brevis*を検出することが可能な方法を開示した。しかし、乳酸菌はわずか1菌体でも製品ビール中に混入すれば、やがて増殖して混濁を起こす可能性があることを考えれば、さらに高感度な乳酸菌の検出法が望まれる。そこで、本発明の目的は、前述の方法を上回る感度の乳酸菌の検出法を提供することにある。

【0003】

【課題を解決するための手段】 本発明は、下記の工程よりなる乳酸菌の高感度検出法に関する。(1) 乳酸菌を含む検体をポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて濾過する工程、(2) 該フィルターを、揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させた後、揮発性溶液を蒸発させる工程、(3) 上記工程で得た検体試料をlysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSで処理することによって乳酸菌のDNAを抽出する工程、(4) 上記工程で得た抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する工程、(5) 乳酸菌DNAに対して、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う工程、

ブランフィルターを用いることにより、乳酸菌の回収率を向上させることができる。

【0005】 次に、濾過に用いたフィルターを揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させる。ここで、揮発性溶液は乳酸菌のDNAに損傷を与えないようなものであればよく、アルコール系、フェノール系などのヒドロキシル基含有化合物が好適であり、特にエタノールが好ましい。揮発性溶液中で超音波処理を行い菌体をフィルターより遊離させた後、エタノール等の揮発性溶液を蒸発させることにより検体の容量を短時間で減少させる。

【0006】 次に、lysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSを用いることによって検体中より乳酸

菌のDNAを効率よく抽出する。エタノール沈澱処理によって乳酸菌のDNAを回収する際に、tRNAを共沈物として用いることによって回収率を高めることができる。

【0007】さらに、PCRの効率を上げる手段として、ゲノム当たり複数個存在することが知られているrR

5' - TGTGGTGCGATAGCCTGAA - 3' (a)

5' - GCGTGGCAACGTCCTATCCT - 3' (b)

【0008】なお、本発明ではPCRを行う際に、Taq Polymeraseよりも耐熱性と正確さに優れているPfu Polymeraseを使用することによって、一層効率よくPCRを行うことができる。PCRを行って乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う。

【0009】乳酸菌の検出は、種々の方法により実施することができるが、本発明では例えば上記の酵素反応液をポリアクリルアミド電気泳動またはアガロース電気泳動にかけることにより行い、増幅されたヌクレオチド断片の存在とその長さを確認することができる。その結果から、検体中にプライマーが認識すべきヌクレオチドが存在しているか否かを判定できる。判定は、臭化エチジウムによる核酸染色により行う。この判定により、乳酸菌の有無を判定するのである。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、他の電気泳動やクロマトグラフィーも有効である。

【0010】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例1

PCR用サンプルの調製

250mlのビールに様々な数の *L. brevis* JCM1059^T を添加（菌数はコロニーカウント法により測定）した検体を、ポリカーボネート製メンブレンフィルター（直径47mm、膜厚10μm、孔径0.4μm、Millipore社製、アイソポアメンブレン）で吸引濾過した後、該フィルターを10ml容のチューブに入れ、5mlのエタノールを添加する。超音波処理5分、振とう30分の後、フィルターを取り除き、チューブ内のエタノールを濃縮遠心機にて蒸発させた後、検体を100μlの滅菌水に溶かす。

【0011】次に、上記検体溶液に150μlの溶菌液A〔(1.67 M sucrose/0.8mg/ml lysozyme/16.8μg/ml mutanolysin) in 16.7 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)〕を添加し、37℃で30分処理した後、150μlの溶菌液B〔(13.3mM MgCl₂/2.7% triton X-100/2.7% diethyl pyrocarbonate/0.27mg/ml proteinase K/6.7% SDS) in 10 mM potassiumphosphate buffer(pH 6.8)〕を添加し、70℃で10分処理して溶菌を行った。その後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱処

理を行って核酸成分を精製した。なお、エタノール沈澱処理の際に共沈物として500ngのtRNAを用いた。この後、10μlの緩衝液（10mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1mM EDTA）に溶かし、これをPCR用サンプルとした。

【0012】プライマーの合成

*L. brevis*の5S rRNA遺伝子の配列（Woese, C.R. et al., J. Mol. Evol. 8, 143-153 (1976)）から前記した配列(a), (b)を選び、それと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。なお、DNA合成および精製は宝酒造株式会社に委託した。

【0013】PCR

PCR用サンプルに、終濃度500nMのプライマー(a)および(b)、200μMのdNTPs および10X Pfu Polymerase用反応液（TOYOBO社製）を加えて全量を99.5μlとした。これを94℃で5分、45℃で5分処理した後、75℃に温度を維持しつつ1.25UのPfu Polymerase（TOYOBO社製）を添加した。この後、直ちに以下の条件でPCRを行った。なお、温度制御はTAITEC社製、TR-100を用いて行った。

【0014】熱変性：94℃、30秒

アニーリング：45℃、5秒

重合反応：75℃、10秒

以上を1サイクルとして40サイクル実施

【0015】検出

反応液から、増幅されたヌクレオチド断片を検出する方法として、縦型の5%ポリアクリルアミド電気泳動（Bio-Rad社製、Mini-PROTEAN II）を行った。PCR処理後の反応液から10μlを取り出し、泳動を行った。泳動は、TBE溶液（89mM Tris/89mM boric acid/2mM EDTA (pH 8.0)）を用い、300Vで6分を行った。その後、ゲルを臭化エチジウム溶液（0.5μg/ml）にて染色し、紫外線照射によって視覚化した。

【0016】結果

図1に示したように、ビールに1菌体の *L. brevis* を添加した場合、試験した9点中3点が陽性（正解率33%）となった。その他の菌数の場合、表1のような結果となった。

【0017】

【表1】

表1 L. brevis 添加 (1~9 cells/250ml of beer) 試験結果

菌数 (cells)	陽性となった数/試験した数	正解率 (%)
1	3/9	33
3	7/12	58
5	8/12	66
8	5/6	83
9	6/6	100

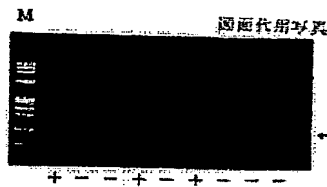
【0018】

【発明の効果】本発明の方法によれば、ビールなどの食品に含まれる乳酸菌を非常に高感度に検出することができる。しかも、本発明の方法に要する時間は、全工程で約11時間であり、従来の方法に比べ乳酸菌の検出に要する時間を大幅に短縮することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 L. brevis 添加 (菌数1個/ビール250ml) 試験結果を示す電気泳動写真である。矢印は、PCRによって増幅されたバンドを示し、このバンドが観察されるものを陽性 (+)、観察されないものを陰性 (-) とした。MはDNAサイズマーカーである。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C12R 1:225)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-289295

(43)Date of publication of application : 07.11.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

```
// C12H 1/00
```

(C12N 15/09

C12R 1:225)

(C12N 15/09

C12R 1:24)

(C12N 15/09)

C12R 1:245)

(C12N 15/09)

C12R 1:25)

(21)Application number : 06-092448

(71)Applicant : KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 28.04.1994

(72)Inventor: YASUI TETSUJI

(54) DETECTION OF IDENTIFICATION OF LACTOBACILLUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel 16Sr RNA gene of a lactobacillus which can promptly and steadily detect or identify lactobacillus of types being difficult in detection or identification and containing a part or the whole part of a specific base sequence, for example, the prompt detection of lactobacillus which deteriorates the quality of beer.

CONSTITUTION: A novel *Lactobacillus* 16Sr RNA which contains a part or the whole part of the base sequence containing the base sequence of the formula, thus can promptly detect or identify the *Lactobacillus* which cannot be detected or identified with the known primers for detecting *Lactobacilli* and can judge the presence or absence of the *Lactobacillus* hazardous to beer such as *Lactobacillus brevis* or *Lactobacillus casei* deteriorating beer qualities. This gene is obtained by selecting a strain which can proliferate in beer and is inert in the antigen-antibody reaction with anti-*Lactobacillus brevis* JCM 1170 serum from hetero-type fermentation *Lactobacilli* separated from beer or beer factory and separating its 16S ribosome RNA according to an ordinary process.

[illegible]

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.11.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3677056

[Date of registration]

13.05.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]